

平成21年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590716  
 研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における白血球除去療法を用いた制御性T細胞を応用した細胞治療の開発  
 研究課題名（英文） The development of regulatory T cell therapy using leukocyte apheresis for inflammatory bowel disease.  
 研究代表者  
 長堀 正和（NAGAHORI MASAKAZU）  
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：60420254

研究成果の概要：研究期間内に、ヒト単球にはCD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>の異なるフェノタイプが存在を明らかとした。さらに、CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>単球はHLA-DRおよび共刺激分子CD86の発現がより高く、さらに、TNF $\alpha$ 、IL-12、IL-18といったproinflammatoryサイトカインの産生もより高値であった。これら単球のうち、CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>単球に対して、抗ヒトTNF $\alpha$ 抗体インフリキシマブは強いアポトーシス活性を有し、ヒト炎症性腸疾患における責任細胞がTNF $\alpha$ を含む様々なproinflammatoryサイトカインを産生するCD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>単球である可能性を示唆した。さらに、興味深いことに白血球除去療法のうちLCAP（セルソーバー）はCD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>単球に比べCD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>単球を選択的に除去することを明らかとした。このことは、従来、臨床先行型に開発应用されてきた白血球除去療法の作用機序として、体外式抗TNF $\alpha$ 抗体療法が想定され臨床的にも意義深い知見と言えるかもしれない。今後の研究期間内に、さらに特異的体外式抗TNF $\alpha$ 療法として、白血球除去療法カラム内での抗TNF $\alpha$ 抗体吸着ビーズの開発を展開する予定である。さらに今年度は白血球除去療法による上皮細胞への影響を解析し、除去療法後の上皮細胞のなかで増殖細胞が増加傾向で有ることを確認し、腸上皮再生作用の可能性も示唆された。今後の研究にて再生機構の詳細な解析を行う予定である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学、消化器学（食道、胃、小腸、大腸）

キーワード：炎症性腸疾患、白血球除去療法、新規治療法、潰瘍性大腸炎、クローン病

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は就学、就労、結婚、出産といった人生の真最中の若年者を襲い再燃と緩

解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病である。多くの症例にステロイドや免疫抑制剤による治療が施されるが、その副作用の問題による長期投与の

限界と、今後、炎症性腸疾患患者の長期経過例の急増を考慮すると、副作用、QOLをも考慮した新規の病態特異性を有する治療法の開発が急務である。

近年、クローン病の病態において活性化マクロファージ由来の腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )が重要な役割を果たすことが明らかにされ、欧米、本邦において難治性クローン病患者の対する抗TNF $\alpha$ 抗体の臨床応用にて極めて良好な治療成績を収めている。さらには、潰瘍性大腸炎に対しても抗TNF $\alpha$ 抗体療法の有効性が質の高い臨床試験にて報告されており欧米での臨床応用が開始されている。しかし、一方では抗体の投与に伴う結核など重篤な感染症や抗TNF $\alpha$ 抗体そのものが誘発する予後不良な癌や悪性リンパ腫の発生の危険性は否定し得ない現状に直面している。一方、潰瘍性大腸炎においては体外処理による白血球除去療法(顆粒球除去療法やリンパ球除去療法)は、ステロイド抵抗性の病態に対して上述のようなリスクの少ない緩解導入効果を持つことが認められ、本邦ですでに優れた臨床成績が多数報告されている(Kanai T, et al. *Expert Opin on Biol Ther.* 6: 453-66, 2006)。また、近年、この白血球除去療法はクローン病にも治療効果が認められ拡大臨床応用が期待される場所である。

## 2. 研究の目的

体外処理による白血球除去療法(顆粒球除去療法、リンパ球除去療法、遠心分離法)は、ステロイド抵抗性の病態に対して緩解導入効果を有し、すでに優れた臨床成績が多数報告されている。以上、近年の炎症性腸疾患治療の進歩と併存する問題点に着目し、特異的な優れた治療効果と副作用クリアーを併せ持つ新規治療法、すなわち、膜型 TNF $\alpha$  産生細胞特異的除去白血球除去療法を開発と白血球除去療法による特異的細胞に除去するという発想を転換し、特異的‘良性’細胞、すなわち、自己免疫疾患病態を抑制するで知られている制御性T細胞のみを生体へ戻すという白血球除去療法アシスト選択的制御性T細胞再移入療法を開発、さらには、循環系白血球一過性除去に伴う骨髄造血刺激という発想に基づき、組織修復期に骨髄より動員される腸管上皮細胞幹細胞動員システムに白血球除去療法を応用する、3つの全く独創的な治療法の開発に着手することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 腸管上皮細胞再生誘導と白血球除去療法の位置付け—マウスでの検討

白血球除去療法が活性化白血球の数的減少のみならず質的な変化を誘導し、結果と

して骨髄細胞の腸管上皮細胞への **transdifferentiation** 機構の促進因子として作用することによりクローン病治療に有効である可能性を追求する。骨髄細胞の腸管上皮細胞への **transdifferentiation** 機構が、末梢血中の特定の白血球分画の細胞においてのみ機能する可能性を検討する。

i) EGFP トランスジェニックマウスをドナーとし、致死量放射線照射マウスへ骨髄移植をおこなう。移植後種々の期間を経て屠殺したマウスの食道・胃・小腸・大腸につき、組織学的検索方法を用いることにより、骨髄由来上皮細胞を可視化することを試みる。さらにそれら細胞の局在(体前後軸上および陰窩軸上)、分化の頻度、およびその経時的変化につき詳細な検討をおこなう。

ii) i)における実験システムを構築後、**FACS Vantage** を用いてこれらドナー由来骨髄細胞を各種細胞表面マーカーの相違により分離・採取し、同様の解析をおこなう。これらにより、上皮細胞への高い分化能を有する骨髄細胞分画を明らかにする。

### 2) 腸管上皮細胞再生誘導と白血球除去療法の位置付け—ヒト での検討

クローン病患者白血球除去療法前後において末梢血検体および上部・下部消化管内視鏡検査による生検検体を採取し、以下の検討を加える。

i) マウスを用いた解析により高い上皮細胞分化能を有する骨髄細胞分画が、クローン病患者白血球除去療法前後において変化する可能性を、**FACS**による表面マーカー解析(CD34など)により検討する。

ii) ヒト炎症性腸疾患炎症粘膜における **Notch**シグナル関連分子(**Hes1**, **Math1**)の発現を検討・患者組織標本を用いた免疫組織学的検討と分子生物学的解析を行う

iii) 分離した末梢血幹細胞を用いた **Hes1**, **Math1** 分子の蛋白、遺伝子レベルでの解析を行う。

## 4. 研究成果

### 1) 腸管上皮細胞再生誘導と白血球除去療法の位置付け—マウスでの検討

EGFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞をドナーとし、致死量放射線照射マウスへ骨髄移植を行った。腸管での骨髄由来細胞の生着を確認するために、組織染色を行った。抗EGFP抗体により正着した細胞を確認したところ、血球細胞がほとんどであり、腸管上皮細胞への移行はほとんど認められなかった。さらにDSS腸炎を起こし、炎症状態での骨髄由来細胞の動員を確認したが上皮細胞への移行はほとんど認められなかった。そのため、ヒトにおける

LCAP の検討に重点を置くこととした。

2) 腸管上皮細胞再生誘導と白血球除去療法の位置付け—ヒト—での検討

倫理審査委員会による承認、患者の同意のもと、LCAP による検討を行った。潰瘍性大腸炎患者 35 名に対し LCAP 療法を施行し、その前後における臨床的改善、血管内血球組成、上皮細胞成分解析を行った。

LCAP 施行にて 35 例中 30 例にて臨床的改善を認めた。

さらに患者血液を採取し LCAP 前後の血球成分を解析したところ、CD4 陽性リンパ球、B 細胞の組成に関して変化を認めなかったが、CD14<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>、CD16 陽性の単球の血液内細胞数が LCAP 後に有意に減少していた。

この CD14<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>、CD16 陽性のヒト単球の性状をさらに解析したところ、この単球は TNF $\alpha$ 、IL-12 などの炎症性サイトカインを多量に分泌することを発見した。LCAP によるこの単球集団の除去は炎症性サイトカイン産生細胞を選択的に除去していることを示唆し、LCAP 療法の分子ターゲットを同定することに成功した。

またその際の上皮細胞の影響を解析した。LCAP 前後で大腸内視鏡を施行し、炎症による粘膜障害部分を生検施行し、病理学的検討にて比較した。LCAP 前後において杯細胞、吸収上皮細胞の細胞数に変化を認めなかったが、ki-67 染色にて増殖細胞が有意に LCAP 後に増加している事を明らかとした。LCAP による細胞増殖機構が存在することが示唆され、この増殖が粘膜再生に繋がることを期待される。現在腸管上皮細胞分化遺伝子である Atoh1 などの発現を解析中である。また細胞増殖を促進させる因子に関しても検索を開始している。

以上より、本研究の施行により、ヒト潰瘍性大腸炎における LCAP 療法の効果を確認できたとともに、血球成分の特定した分画の細胞集団の差異を抽出し、その分子生物学的標的も同定できた。さらに上皮細胞増殖効果も確認出来たことから、臨床的な抗炎症作用を多角的に評価しえた。今後 CD16 抗体による CD16 陽性単球の選択的除去療法などの可能性も広げられたことなど高い成果を挙げることができた。よって本研究の目的は達成されたと考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia.

*Am J Physiol GI & Liver*. 296: 23-35, 2009. 査読有

2. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer.

*Biochem Biophys Res Commun* . 368: 923-929, 2008. 査読有

3. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis* . 14:1491-1503, 2008. 査読有

4. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol* . 180: 383-390, 2008. 査読有

5. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion and survival of colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells in chronic colitis. *J Immunol*. 180: 5291-5299, 2008. 査読有

6. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Watanabe M: Colitogenic CD4<sup>+</sup> effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis* . 14:1630-1640, 2008. 査読有

7. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol* . 178: 4937-4946, 2007. 査読有

8. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology*. 132: 176-189, 2007. 査読有

9. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J*

**Immunol.** 178: 4737-4748, 2007. 査読有  
10. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and  $\beta$ -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in human colon cancer. **Gastroenterology.** 132: 208-220, 2007. 査読有  
11. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K, Totsuka T, Watanabe M: Extracorporeal Elimination of TNF $\alpha$ -Producing CD14 dullCD16 Monocytes in Leukocytapheresis Therapy for Ulcerative Colitis. **Inflamm Bowel Dis.** 13:284-290, 2007. 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Dysregulated differentiation of intestinal epithelia in UC. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. Korea (Seoul), 2008年9月20日
2. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and persistence of chronic colitis. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月22日
3. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Stabilization of Atoh1 protein induces Mucin2 gene expression in human colon cancer cells. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月23日
4. Okamoto R, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Activated notch signaling suppresses generation of goblet cells in the human intestinal mucosa. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日
5. Tsuchiya K, Inoue K, Aragaki M, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene, resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日
6. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- $\alpha$  inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長堀 正和 (NAGAHORI MASAKAZU)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院  
消化器内科・助教  
研究者番号:60420254

### (2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・消化器病態学 教授 (H19)  
研究者番号:10175127

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)  
慶應義塾大学・内科・准教授 (H19)  
研究者番号:40245478

深尾 太郎 (FUKAO TARO)  
慶應義塾大学・医学部・助教 (H19)  
研究者番号:20401127

### (3) 連携研究者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・消化器病態学 教授 (H20)  
研究者番号:10175127

金井 隆典 (KANAI TAKANORI)  
慶應義塾大学・内科・准教授 (H20)  
研究者番号:40245478